

# Мутации *FGFR3*, *TERT*, *TP53* и экспрессия гена *FGFR3* как прогностические критерии при раке мочевого пузыря

Д.С. Михайленко<sup>1, 2</sup>, С.А. Сергиенко<sup>3</sup>, Е.Б. Кузнецова<sup>2</sup>, И.Н. Заборский<sup>3</sup>, М.И. Мартынов<sup>4</sup>, О.Б. Лоран<sup>4</sup>, Г.Д. Ефремов<sup>3</sup>, С.И. Самойлова<sup>2</sup>, Б.Я. Алексеев<sup>3, 5</sup>, В.В. Мусатова<sup>1</sup>, И.В. Буре<sup>2</sup>, М.В. Немцова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

<sup>4</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

<sup>5</sup>Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»; Россия, 125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11

**Контакты:** Дмитрий Сергеевич Михайленко dimserg@mail.ru

**Введение.** Рак мочевого пузыря (РМП) входит в число частых онкоурологических заболеваний, 75 % его случаев представлены немышечно-инвазивной формой. После удаления первичной опухоли при немышечно-инвазивном РМП остается важным вопрос оценки злокачественности и риска прогрессии опухоли, так как с ним связан выбор периодичности выполнения цистоскопий, режимов БЦЖ-терапии или химиотерапии.

**Цель исследования** — совершенствование алгоритмов прогноза у пациентов с немышечно-инвазивным РМП промежуточного риска прогрессирования заболевания с учетом молекулярно-генетических особенностей первичной опухоли.

**Материалы и методы.** Исследованы 125 образцов РМП, в которых определены мутации генов *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT* и *TP53* методами полимеразной цепной реакции и секвенирования по Сэнгеру, а также экспрессия генов *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1* и *GATA3* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** Соматические мутации в исследованных участках генов были выявлены в 65,6 % образцов, идентифицированы 5 новых мутаций. Показаны снижение частоты мутаций в генах *FGFR3* и *TERT*, увеличение — в *TP53* в ряду (*Ta*—*T1/low G*) > (*T1/high G*) > (>*T2/любая G*). Наибольшей площадью под ROC-кривой ( $0,807 \pm 0,092$  при  $p = 0,004$ ) характеризовался прогностический классификатор в случае включения в расчет независимых переменных: мутация в *FGFR3* и/или *TERT*; мутация *TP53*; гиперэкспрессия гена *FGFR3*. Наличие мутации *FGFR3*, *TERT* и/или гиперэкспрессии *FGFR3* в отсутствие мутации *TP53* указывает на малоинвазивные первичные опухоли. Напротив, наличие мутации *TP53* свидетельствует о том, что на генетическом уровне опухоль демонстрирует черты мышечно-инвазивного РМП. С использованием этого алгоритма мы реклассифицировали 21 случай РМП T1G3 как имеющий характеристики неинвазивных опухолей у 43 %, инвазивного РМП — у 57 % пациентов.

**Заключение.** Предложенная прогностическая модель может рассматриваться в будущем как дополнительный лабораторный тест при оценке злокачественности немышечно-инвазивного РМП.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, соматическая мутация, экспрессия генов, полимеразная цепная реакция, секвенирование, прогностический классификатор, кластер TCGA

**Для цитирования:** Михайленко Д.С., Сергиенко С.А., Кузнецова Е.Б. и др. Мутации *FGFR3*, *TERT*, *TP53* и экспрессия гена *FGFR3* как прогностические критерии при раке мочевого пузыря. Онкоурология 2021;17(1):89–100. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-89-100.

DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-89-100



## *FGFR3*, *TERT*, *TP53* mutations and the *FGFR3* gene expression in bladder cancer as prognostic markers

D.S. Mikhaylenko<sup>1, 2</sup>, S.A. Sergienko<sup>3</sup>, E.B. Kuznetsova<sup>2</sup>, I.N. Zaborsky<sup>3</sup>, M.I. Martynov<sup>4</sup>, O.B. Loran<sup>4</sup>, G.D. Efremov<sup>3</sup>, S.A. Samoylova<sup>2</sup>, B.Ya. Alekseev<sup>3, 5</sup>, V.V. Musatova<sup>1</sup>, I.V. Bure<sup>2</sup>, M.V. Nemtsova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

<sup>3</sup>National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2<sup>nd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>4</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia;

<sup>5</sup>Medical Institute of Continuing Education, Moscow State University of Food Production; 11 Volokolamskoe Shosse, Moscow 125080, Russia

**Background.** Bladder cancer (BC) is a common urological cancer, 75 % of which are non-muscle invasive BC. After removal of the primary tumor, the adequate classification of malignancy and the defining of tumor progression risk remains an important issue, since it is associated with frequency of cystoscopy and choice of the BCG- or chemotherapy management.

**Objective:** improve the algorithms of prognosis in intermediate-risk patients with non-muscle-invasive bladder cancer with the consideration of molecular characteristics of the primary tumor.

**Materials and methods.** We studied 125 BC samples; mutations in the *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT*, and *TP53* genes were determined by polymerase chain reaction and Sanger sequencing, as well as the expression of the *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1*, and *GATA3* genes using real-time polymerase chain reaction.

**Results.** Somatic mutations in the studied loci were detected in 65.6 % of the samples, five new mutations were identified. A decrease of the mutation frequency in the *FGFR3* and *TERT* genes was shown, an increase — *TP53* in order ( $Ta-T1/low\ G$ ) > ( $T1/high\ G$ ) > ( $>T2/any\ G$ ). The largest area under the ROC curve ( $0.807 \pm 0.092$ ,  $p = 0.004$ ) was demonstrated for the prognostic classifier with the independent variables: mutation in *FGFR3* and/or *TERT*; mutation *TP53*; overexpression of the *FGFR3* gene. The *FGFR3*, *TERT* mutations and/or *FGFR3* overexpression in the absence of *TP53* mutation indicates minimally invasive primary tumor. On the contrary, harboring *TP53* mutation indicate the features of muscle-invasive BC at the genetic level. Using this algorithm, we reclassified 21 of T1G3 BC cases as having characteristics associated with non-invasive tumor in 43 %, and invasive BC in 57 % of patients.

**Conclusion.** The aforementioned prognostic model could be used as additional laboratory test in assessing the malignancy and progression risk of non-muscle invasive BC.

**Key words:** bladder cancer, somatic mutation, gene expression, polymerase chain reaction, sequencing, prognostic classifier, TCGA cluster

**For citation:** Mikhaylenko D.S., Sergienko S.A., Kuznetsova E.B. et al. *FGFR3*, *TERT*, *TP53* mutations and the *FGFR3* gene expression in bladder cancer as prognostic markers. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2021;17(1):89–100. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-89-100.

## Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) по распространенности занимает 13-е место среди всех онкологических заболеваний и 9-е место среди онкологических заболеваний у мужчин в России, является актуальной проблемой современной онкоурологии [1]. Ежегодно в мире регистрируют около 549 тыс. новых случаев РМП и 200 тыс. летальных исходов от этого заболевания [2]. В 80 % случаев выявляют немышечно-инвазивный РМП (НМИРМП) на стадиях Ta, T1, карциномы *in situ* (CIS) по классификации TNM, в 25 % случаев — мышечно-инвазивный РМП (МИРМП) на стадии T2 и выше, а также распространенные формы заболевания с метастазами [3, 4].

С точки зрения молекулярного патогенеза НМИРМП и МИРМП развиваются по различным путям. Для НМИРМП характерны точечные активирующие мутации в онкогенах *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT*, генах RAS-семейства, генах эпигенетической регуляции (*KDM6A* и некоторых других), и предраковые изменения на морфологическом уровне характеризуются в основном гиперплазией. МИРМП развивается, как правило, через стадии дисплазии и CIS, для него характерны мутации в генах ремоделирования хроматина, генах-супрессорах *TP53*, *RB1*, *PTEN*, а также множественные хромосомные перестройки, возникшие путем хромотрипсиса [5].

Несмотря на то что НМИРМП, по сравнению с МИРМП, характеризуется благоприятным прогнозом, остаются актуальными вопросы поиска биомаркеров рецидива НМИРМП, частота которого достигает 45–60 % в течение 5 лет после удаления первичной опухоли в ходе трансуретральной резекции. Не менее

важной является задача формирования прогностических систем маркеров, которые позволят заранее выделять когорту пациентов с высокой вероятностью перехода опухоли в инвазивную и метастазирующую форму (таких при НМИРМП насчитывают 10–15 % случаев), особенно в группе промежуточного прогноза Ta–high G и T1–low/high G, а также определять опухоли, резистентные к адъювантной химио- и иммунотерапии [4, 6, 7].

В настоящее время рассматривают несколько подходов к созданию прогностических классификаторов, основанных, как правило, на иммуногистохимических (ИГХ) и генетических критериях. Если использовать ИГХ-метод, то для отнесения образца к одному из прогностических кластеров может потребоваться до 25–26 антител к специфическим клеточным антигенам, что является довольно трудоемким и дорогостоящим анализом [8]. Анализ дифференциальной экспрессии генов при РМП на микрочипах высокой плотности позволяет получать экспрессионные профили, ассоциированные с прогнозом РМП. Однако эти профили характеризуются низкой воспроизводимостью в других исследованиях и себестоимость их анализа также высока [9, 10]. Ряд авторов исследовали сокращенные профили, например только гены, имеющие отношение к иммунной системе, или 50–100 генов, выбранных на основании предварительного эксперимента, но предвзятый выбор этих генов также отрицательно сказывается на воспроизводимости результатов в других работах [11, 12].

Наиболее информативное профилирование было предложено авторами из Университета Северной Каролины, группой Лунда по изучению РМП, группой

Андерсена и другими исследователями на основании информации в базе данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) [13]. База TCGA содержит информацию о мутациях, изменениях в экспрессии генов и эпигенетических нарушениях в сотнях образцов опухолей, относящихся к онкоурологическим заболеваниям, и может быть использована для биоинформатического анализа экспериментальных данных различных авторов или выбора генов-кандидатов в планируемом с определенной целью исследовании РМП [14].

В целях формирования панели прогностических маркеров для определения прогноза НМИРМП по мутациям и изменению экспрессии ограниченного количества генов, которые можно было бы выявлять с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или другими молекулярно-генетическими методами, не требующими обязательного применения микрочиповых технологий, нами были изучены мутации генов *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT*, *TP53* и экспрессия генов *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1*, *GATA3*. Этот выбор был сделан на основании ранее опубликованных данных метаанализа 2411 случаев РМП по критериям TCGA, анализа основных классифицирующих признаков для отнесения к базальному, люминальному и другим минорным типам РМП с прогностическим значением, а также ассоциаций с химио- и иммунотерапией [15–17].

**Цель исследования** – совершенствование алгоритмов прогноза у пациентов с НМИРМП промежуточного риска прогрессирования заболевания с учетом молекулярно-генетических особенностей первичной опухоли.

### Материалы и методы

**Характеристика выборки.** Исследованы образцы замороженных опухолевой и условно нормальной тканей, полученных от 125 больных первичным РМП, которым проводили хирургическое лечение. Трансуретральная резекция была выполнена 106 пациентам со стадиями Ta–T1, цистэктомия – 19 пациентам с распространенными формами заболевания. По распространенности первичной опухоли согласно классификации TNM 10,4 % (13/125) случаев соответствовали стадии Ta, 74,4 % (93/125) – T1, 13,6 % (17/125) – T2, по 1 случаю приходилось на стадии T3 и T4. Высокодифференцированные опухоли (low grade) составляли 80,2 % (85/106), низкодифференцированные (high grade) – 19,8 % (21/106) случаев среди опухолей Ta–T1.

**Анализ точковых мутаций.** Геномную ДНК из опухолевой и условно нормальной тканей выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Предварительно проводили гомогенизацию тканей размером 2 × 2 мм со стеклянными шариками и лизис образца в объеме 200 мкл

с протеиназой. Полученные образцы геномной ДНК использовали для постановки ПЦР. Последовательности праймеров для экзонов 7 и 10 *FGFR3*, экзонов 9 и 20 *PIK3CA* опубликованы нами ранее [18]. При тех же условиях амплификации использовали праймеры для промотора *TERT* [19] и экзонов 5–9 *TP53* [20]. Реакционная смесь содержала 50–100 нг геномной ДНК, 2,5 мМ хлорида магния, 1,5 мМ каждого dNTP, по 2 пмоль прямого и обратного праймеров для каждого локуса, 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл буфера для ПЦР 5x (Интерлабсервис, Россия), объем смеси составлял 25 мкл. Температурные параметры ПЦР: 95 °C 1 мин 45 с, затем 35 циклов при 95 °C 45 с, 60 °C 25 с, 72 °C 30 с, финальная элонгация при 72 °C 50 с.

Для инактивации не вошедших в реакцию праймеров и dNTPs к 7 мкл ПЦР-смеси после окончания реакции добавляли 4 е.а. экзонуклеазы 1 из *Escherichia coli* (Fermentas, Литва) и 1 е.а. щелочной фосфатазы из кишечника теленка (СибЭнзим, Россия), по 0,5 мкл 10x-буферов для указанных ферментов, общий объем смеси 10 мкл. Инкубировали образцы в течение 1 ч с последующей инактивацией ферментов при температуре 85 °C 10 мин. Далее проводили реакцию получения пула меченых фрагментов с помощью набора BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру осуществляли на капиллярном генетическом анализаторе 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

**Исследование экспрессии генов.** Тотальную РНК выделяли из гомогенатов тканей с помощью набора «РНК-сорб» (НекстБио, Россия). Затем обрабатывали образцы ДНКазой (СибЭнзим, Россия) по протоколу производителя. Полученные препараты РНК использовали в реакции обратной транскрипции с применением набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Экспрессию генов определяли методом ПЦР в реальном времени с TaqMan-зондами по алгоритму  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  на детектирующем термоциклере DT Prime (ДНК-технология, Россия). Каждую реакцию проводили в 3 повторениях. Использовали смеси локус-специфичных праймеров и зондов FAM-MGB (Thermo Fisher Scientific, США): Hs00179829\_m1 (*FGFR3*), Hs01076088\_m1 (*EGFR*), Hs01001580\_m1 (*ERBB2*), Hs04187555\_m1 (*FOXA1*), Hs00231122\_m1 (*GATA3*) и Hs02786624\_g1 (*GAPDH* – референсный ген). Состав реакции: 10 мкл реакционной смеси TaqMan Universal Master Mix II, 1 мкл препарата комплементарной ДНК (кДНК), 1 мкл TaqMan Gene Expression Assay, до 20 мкл деионизированной воды. Температурные параметры: 95 °C 10 мин, далее 45 циклов включали 95 °C 15 с, 60 °C 1 мин.

**Статистический анализ данных.** На первом этапе определяли частоты мутаций и средние значения экспрессии генов в ткани опухоли относительно условной нормы. Сравнительный анализ частоты мутаций между

группами проводили с помощью точного критерия Фишера и  $\chi^2$ -критерия. Далее выполняли логистическую регрессию и кластерный анализ для мутаций и гиперэкспрессии отдельных генов. Для сравнения показателей между несколькими группами также применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Расчеты проводили с помощью программ GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, США) и Statistica 10.0 (StatSoft, Россия).

### Результаты

**Мутации генов *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT* и *TP53* в исследованной выборке.** Исследованы 125 образцов ДНК опухолевой ткани на наличие мутаций в экзонах 7 и 10 гена *FGFR3*. Точковые мутации были выявлены в 31,2 % (39/125) образцов, все мутации были соматическими, что подтверждено секвенированием тех же локусов в ДНК из условно нормальной ткани. Наиболее часто встречались мутации с.746C>G (р.S249C) – 55 % (22/40), с.1124A>G (р.Y375C) – 25 % (10/40) и с.742C>T (р.R248C) – 7,5 % (3/40) (табл. 1). В образцах от 2 пациентов была выявлена мутация с.1144G>A (р.G382R), в единичных случаях – с.1117A>T (р.S373C) и с.815A>T (р.E272V). В 1 случае наблюдали сочетание мутаций р.S249C и с.1156T>C (р.F386L). Шесть мутаций *FGFR3* ранее были обнаружены при разных типах опухолей и описаны как драйверные активирующие мутации, мутация р.E272V выявлена нами впервые, ее патогенное значение пока не охарактеризовано.

Анализ мутаций в экзонах 9 и 20 гена *PIK3CA* позволил определить мутации в 11 % (14/125) случаев. Наиболее распространенной мутацией была с.3140A>G (р.H1047R) с частотой 42,9 % (6/14), частоты других

мутаций составили: с.1634A>C (р.E545A) – 28,6 % (4/14), с.1633G>A (р.E545K) – 14,3 % (2/14), в единичных случаях обнаружены мутации с.1624G>A (р.E542K) и с.3140A>T (р.H1047L). Все выявленные мутации *PIK3CA* ранее охарактеризованы как драйверные активирующие мутации в злокачественных опухолях.

Кроме точковых мутаций в кодирующих областях нами изучены «горячие точки» в промоторе гена *TERT*. Мутации *TERT* были выявлены в 41 % (51/125) случаев. В тестируемом участке промотора обнаружены мутации с.–124C>T – 76,5 % (39/51), с.–146C>T – 21,6 % (11/51), в 1 случае – с.–124C>A. Точковая мутация хотя бы в 1 из 3 исследованных онкогенов *FGFR3*, *PIK3CA* и *TERT* была выявлена в 58,4 % (73/125) образцов РМП.

В ходе работы были выявлены 13 различных соматических мутаций в гене *TP53*, из них р.S241F и с.782-8del16 были обнаружены в 1 образце, возможно, отражая процесс инактивации гена-супрессора *TP53* согласно двухударной модели Кнудсена или клональную гетерогенность опухоли. Большинство мутаций составляли однонуклеотидные замены – 76,9 % (9/13) выявленных изменений, из них р.R213\* ранее была описана как инактивирующая нонсенс-мутация при РМП, остальные были миссенс-мутациями (р.E285K встречалась в выборке дважды). В базе COSMIC указано, что 5 из 8 этих миссенс-мутаций ранее были обнаружены в РМП, миссенс-мутации р.G302A, р.V157F и р.R181L описаны при других типах опухолей или определены нами в РМП впервые. В частности, мутация р.G302A находится в кодоне, который подвергается нонсенс-мутациям, и не описана ранее (см. табл. 1).

Однако в этой же позиции *TP53* были идентифицированы мутации р.G302E при колоректальном раке

Таблица 1. Характеристика выявленных мутаций

Table 1. Characteristics of the observed mutations

Ген Gene	Мутация Mutation	COSMIC	Тип мутации <sup>1</sup> Type of mutation <sup>1</sup>	Опухоль <sup>2</sup> Tumor <sup>2</sup>
<i>FGFR3</i>	р.S249C	COSM715	Активирующая Activating	РМП, ПК, НМРЛ, РШМ, тератома BC, SCC, NSCLC, CC, teratoma
	р.Y375C	COSM718	Активирующая Activating	РМП, СК, ОГЗ, РШМ, ПКП, ГК BC, SK, OHD, CC, PRCC, HCC
	р.R248C	COSM714	Активирующая Activating	РМП, ПК, НМРЛ, невус, СК BC, SCC, NSCLC, nevus, SK
	р.G382R	COSM24842	Активирующая Activating	РМП, ПК, РМЖ, РЖ BC, SCC, BRC, GC
	р.S373C	COSM17461	Активирующая Activating	РМП и СК BC and SK
	р.E272V	Her No	VUS	РМП <sup>3</sup> BC <sup>3</sup>
	р.F386L	COSM724	Активирующая Activating	РПЖ, НМРЛ, РШЖ, РМП PC, NSCLC, TC, BC



Ген Gene	Мутация Mutation	COSMIC	Тип мутации <sup>1</sup> Type of mutation <sup>1</sup>	Опухоль <sup>2</sup> Tumor <sup>2</sup>
PIK3CA	p.H1047R	COSM775	Активирующая Activating	РМЖ, КР, ЭК, РЯ, ПК, РМП BRC, CRC, EC, OC, SCC, BC
	p.E545A	COSM12458	Активирующая Activating	РМЖ, РП, РЯ, КР, ЭК, РМП BRC, EPC, OC, CRC, EC, BC
	p.E545K	COSM763	Активирующая Activating	РМЖ, КР, РМП, ПК, НМРЛ BRC, CRC, BC, SCC, NSCLC
	p.E542K	COSM760	Активирующая Activating	РМЖ, КР, РМП, ЭК, ПК BRC, CRC, BC, EC, SCC
	p.H1047L	COSM776	Активирующая Activating	РМЖ, КР, ЭК, РМП, НМРЛ BRC, CRC, EC, BC, NSCLC
TERT	c.-124C>T/A	Het No	Активирующая Activating	РМП, РЩЖ, меланома, ГК [21, 22] BC, TC, melanoma, HCC [21, 22]
	c.-146C>T	Het No	Активирующая Activating	
TP53	c.626_627del	COSM6482	Инактивирующая Inactivating	РМЖ, КР, ПК, РП, глиома, РМП <sup>3</sup> BRC, CRC, SCC, EPC, glioma, BC <sup>3</sup>
	c.789_791del	Het No	VUS	РМП <sup>3</sup> BC <sup>3</sup>
	c.783-1del15	Het No	Инактивирующая Inactivating	РМП <sup>3</sup> BC <sup>3</sup>
	c.782-8del16	Het No	Инактивирующая Inactivating	РМП <sup>3</sup> BC <sup>3</sup>
	p.S241F	COSM10812	Инактивирующая Inactivating	РМЖ, меланома, РМП, КР, ОГЗ BRC, melanoma, BC, CRC, OHD
	p.R249S	COSM10785	VUS	НМРЛ, ГК, РМЖ, РМП, КР NSCLC, HCC, BRC, BC, CRC
	p.R248G	COSM11564	Инактивирующая Inactivating	НМРЛ, ОГЗ, РМЖ, РЯ, КР, РМП NSCLC, OHD, BRC, OC, CRC, BC
	p.V157F	COSM10670	VUS	НМРЛ, ПК, ГК, КР, РП, РМП <sup>3</sup> NSCLC, SCC, HCC, CRC, EPC, BC <sup>3</sup>
	p.E285K	COSM10722	Инактивирующая Inactivating	РМП, РМЖ, КР, НМРЛ, РП BC, BRC, CRC, NSCLC, EPC
	p.R181L	COSM44152	Инактивирующая Inactivating	КР, РМЖ, ПК, РМП <sup>3</sup> CRC, BRC, SCC, BC <sup>3</sup>
	p.P151A	COSM44944	Инактивирующая Inactivating	РМЖ, НМРЛ, КР, ГК, РПЖ, РМП BRC, NSCLC, CRC, HCC, PC, BC
	p.G302A	Het No	VUS	РМП <sup>3</sup> BC <sup>3</sup>
	p.R213*	COSM10654	Инактивирующая Inactivating	КР, РМЖ, меланома, ПК, РМП CRC, BRC, melanoma, SCC, BC

<sup>1</sup>По данным в базе COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk>) и связанных с ней источников, если не указано иное.

<sup>2</sup>Указаны не более 5–6 наиболее частых локализаций.

<sup>3</sup>Впервые описана в настоящей работе.

**Примечание.** РМП – рак мочевого пузыря; ПК – плоскоклеточная карцинома; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; РШМ – рак шейки матки; СК – себорейный кератоз; ОГЗ – онкогематологические заболевания; ПКП – папиллярная карцинома почки; ГК – гепатоцеллюлярная карцинома; РМЖ – рак молочной железы; РЖ – рак желудка; РПЖ – рак предстательной железы; РЩЖ – рак щитовидной железы; КР – колоректальный рак; ЭК – эндометриальная карцинома; РЯ – рак яичников; РП – рак пищевода; VUS – вариант с неизвестным клиническим значением.

<sup>1</sup>According to data in the COSMIC database (<https://cancer.sanger.ac.uk>) and related links, unless otherwise indicated.

<sup>2</sup>No more than 5–6 most frequent localizations are indicated.

<sup>3</sup>Described for the first time in this study.

**Note.** BC – bladder cancer; SCC – squamous cell carcinoma; NSCLC – non-small cell lung cancer; CC – cervical cancer; SK – seborrheic keratosis; OHD – oncohematological diseases; PRCC – papillary renal cell carcinoma; HCC – hepatocellular carcinoma; BRC – breast cancer; GC – gastric cancer; PC – prostate cancer; TC – thyroid cancer; CRC – colorectal cancer; EC – endometrial carcinoma; OC – ovarian cancer; EPC – esophageal cancer; VUS – variant of uncertain significance.

и плоскоклеточном раке верхних дыхательных путей, а также p.G302R — при РМП. Обе известные мутации имеют значение патогенности FATHMM 0,21 и 0,33 соответственно и классифицируются как нейтральные изменения белка TP53. На данном этапе работы мы классифицировали p.G302A как генетический вариант с неизвестной клинической значимостью (variant of uncertain significance, VUS), не исключая того, что он может быть мутацией-пассажем, а не мутацией-драйвером. Мутации p.R249S и p.V157F со значением патогенности FATHMM 0,24 также указаны в базе COSMIC как нейтральные изменения продукта гена, однако они встречаются во многих типах опухолей и в ряде исследований рассматриваются вместе с другими мутациями в качестве драйверных нарушений и прогностических критериев, в связи с чем в нашей работе мы также классифицировали их как VUS. В 4 случаях мутации TP53 представляли собой делеции, описанные нами впервые при РМП. Делеция со сдвигом рамки считывания c.626\_627del описана ранее при разных типах опухолей (не при РМП) как патогенная. Мутация c.789\_791del приводит к делеции лизина в положении 264 полипептидной цепи TP53 и не была описана ранее, данных о ее патогенности пока недостаточно. Вместе с тем при аденокарциноме легкого описана драйверная мутация c.789\_803del (p.L264\_N268del), также приводящая к делеции 5 аминокислотных остатков в указанном участке белка, в том числе L264 [23]. Мутации c.783-1del15 и c.782-8del16 приводят к утрате сайта сплайсинга, в этом участке описаны аналогичные патогенные малые делеции, в связи с чем данные мутации были классифицированы как инактивирующие изменения в TP53. В целом мутации в исследованных участках генов *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT* и *TP53* были выявлены в 65,6 % (43/125) образцов.

**Сравнение профиля мутаций в клинических группах пациентов.** Для последующего сравнительного анализа пациентов разделили на группы условно благоприятного прогноза НМИРМП — 68 % (85/125 пациентов, Ta–T1/low G), высокого риска прогрессирования НМИРМП — 16,8 % (21/125 пациентов, T1/high G) и распространенного РМП — 15,2 % (19/125 пациентов, >T2/любая G). Разделение на указанные группы выполнено с учетом действующей TNM-классификации РМП и цели настоящего исследования. Профиль мутаций предполагалось оценить при увеличении злокачественности РМП в ряду: НМИРМП низкого риска прогрессирования (первичная солитарная опухоль TaG1, папиллярно-уротелиальная карцинома low G, <3 см, без CIS), промежуточного риска (опухоли, не попадающие в категории низкого и высокого риска), высокого риска (наличие любого из следующих факторов: T1, G3, CIS, множественные и рецидивные опухоли >3 см при TaG1/2) и МИРМП (>T2/любая G) согласно действующим рекомендациям Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) [24]. Поскольку в нашей выборке не было образцов в группе промежуточного риска НМИРМП по клиническим и патоморфологическим данным, анализ проводили для оставшихся 3 из 4 групп. Наблюдали достоверное снижение относительной частоты мутаций в генах *FGFR3* и *TERT*, увеличение — в *TP53* в ряду (Ta–T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/любая G). Показана обратная корреляция встречаемости мутаций *FGFR3*, *TERT*, а также комбинации *FGFR3/TERT* с прогрессированием РМП ( $p = 0,001$ ; табл. 2).

**Экспрессия генов 2-го кластера TCGA.** Наряду с анализом часто мутирующих при НМИРМП онкогенов нами проведено исследование экспрессии генов *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXAI*, *GATA3*, входящих в ядро 2-го кластера TCGA по данным J.E. Rosenberg и соавт. [17].

**Таблица 2.** Мутации *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT* и *TP53* в прогностических группах пациентов

**Table 2.** Mutations of the *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT*, and *TP53* genes in prognostic groups of patients

Ген Gene	Ta–T1/low G, %	T1/high G, %	>T2, %	Коэффициент корреляции Спирмена (95 % доверительный интервал) Spearman's correlation coefficient (95 % confidence interval)	Вероятность нулевой гипотезы Probability of the null hypothesis
<i>FGFR3</i>	40,0 (34)	19,0 (4)	5,3 (1)	–0,26 (–0,42...–0,08)	0,004
<i>PIK3CA</i>	11,8 (10)	9,5 (2)	10,5 (2)	–0,02 (–0,21...0,16)	0,791
<i>TERT</i>	45,9 (39)	38,1 (8)	21,1 (4)	–0,17 (–0,34...0,01)	0,048
<i>TP53</i>	4,7 (4)	14,3 (3)	31,6 (6)	0,3 (0,12...0,45)	0,001
<i>F/T*</i>	63,5 (54)	47,6 (10)	21,1 (4)	–0,29 (–0,44...–0,11)	0,001

\*Мутация в *FGFR3* и/или *TERT*.

**Примечание.** В скобках указано количество образцов с мутациями.

\*Mutation in the *FGFR3* and/or *TERT*.

**Note.** The number of samples with mutations is indicated in brackets.

Таблица 3. Гиперэкспрессия *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1* и *GATA3* в прогностических группах пациентов

Table 3. Overexpression of the *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1*, and *GATA3* genes in prognostic groups of patients

Ген Gene	Ta–T1/low G, %	T1/high G, %	>T2, %	Коэффициент корреляции Спирмена Spearman's correlation coefficient	Вероятность нулевой гипотезы Probability of the null hypothesis
<i>FGFR3</i>	52,1 (25/48)	41,2 (7/17)	37,5 (3/8)	–0,15	0,21
<i>EGFR</i>	38,8 (19/49)	43,8 (7/16)	33,3 (4/12)	–0,01	0,94
<i>ERBB2</i>	49,1 (28/57)	44,4 (8/18)	42,9 (6/14)	–0,06	0,74
<i>FOXA1</i>	55,4 (31/56)	46,6 (7/15)	41,7 (5/12)	–0,08	0,47
<i>GATA3</i>	46,6 (27/58)	47,1 (8/17)	35,7 (5/14)	–0,06	0,58

**Примечание.** В скобках указаны абсолютные частоты образцов с гиперэкспрессией.

Note. Absolute frequencies of overexpressed samples are indicated in brackets.

Экспрессию в опухоли относительно условно нормальной ткани определяли с помощью ПЦР в реальном времени по алгоритму  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Образцы были отнесены к имеющим гипер- или гипоекспрессию при изменении количества кДНК исследуемого гена в опухоли относительно нормы более чем в 3 раза. В расчеты по каждому гену были взяты только те образцы, которые позволяли достоверно определить экспрессию референсного и контрольного генов в опухоли и условной норме. Доля образцов с гиперэкспрессией составила: *EGFR* – 39,0 % (30/77), *ERBB2* – 47,2 % (42/89), *FGFR3* – 47,9 % (35/73), *FOXA1* – 51,8 % (43/83), *GATA3* – 44,9 % (40/89). Снижение экспрессии было отмечено в 10,8 % (9/83) случаев для гена *FOXA1*, в 6,7 % (6/89) для *GATA3* и в 1 образце для *ERBB2*.

Сравнительный анализ экспрессии был проведен в тех же группах пациентов, что и анализ мутаций: (Ta–T1/low G), (T1/high G) и (>T2/любая G) (табл. 3). Хотя частота гиперэкспрессии *FGFR3*, *ERBB2* и *FOXA1* снижалась в ряду (Ta–T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/любая G), эти различия были недостоверны при уровне значимости 0,05 и указанном выше количестве проанализированных образцов по каждому гену.

**Комплексный анализ мутаций и экспрессии генов.** Нами выполнено сравнение профиля мутаций всех исследованных локусов и экспрессионных профилей 5 генов, вошедших в исследование, с учетом стадии РМП и степени дифференцировки первичной опухоли. Кластерный анализ был проведен на основе мутаций и экспрессии исследованных генов как независимых признаков и зависимой переменной, принимающей значения от 1 до 3 в ряду (Ta–T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/любая G). Расчеты выполнены для 65 образцов, в которых было возможно оценить экспрессию большинства исследованных генов. Показано, что наиболее инвазивные опухоли характеризовались наличием мутаций *TP53* и отсутствием мутаций *FGFR3*, *PIK3CA* и *TERT* (рис. 1).

Кластеры со значением зависимой переменной, наиболее близким к единице, имели либо мутацию *FGFR3*, *PIK3CA* или *TERT*, либо гиперэкспрессию *FGFR3* без мутаций *TP53*. С учетом полученных результатов, описанных нами в предыдущих разделах, была выполнена множественная логистическая регрессия при включении в расчет независимых переменных: мутации в *FGFR3* и/или *TERT* (mutFGFR3/TERT), мутации *TP53* (mutTP53) и гиперэкспрессии *FGFR3* (FGFR3hyperexpr). Уравнение регрессии:

$$\text{Inv} = 0,677 + 0,959 (\text{mutTP53}) - 1,823 (\text{mutFGFR3/TERT}) - 0,88 (\text{FGFR3hyperexpr}),$$

где Inv – вероятность попадания в группу МИРМП при пороговом уровне этого показателя, равном 0,5, наличие/отсутствие признака принимает значение 1 или 0 соответственно. В этом анализе было проведено сравнение на группах (Ta–T1/low G, Inv = 0) и (>T2/любая G, Inv = 1) для того, чтобы применить полученный результат для реклассификации образцов в промежуточной группе (T1/high G). Площадь под ROC-кривой составила  $0,807 \pm 0,092$  при  $p = 0,004$  (рис. 2). Эта ROC-кривая демонстрирует лучшие диагностические характеристики, чем аналогичная модель на основе анализа мутаций *FGFR3/TERT* + *TP53* или *FGFR3* + *TP53*, показавших по отдельности наиболее выраженные ассоциации в ряду (Ta–T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/любая G).

Используя комбинированный тест на мутации и экспрессию, мы реклассифицировали 21 случай РМП T1G3 как имеющий характеристики неинвазивных опухолей в 43 % (9/21) случаев и, напротив, мышечно-инвазивного РМП – у 57 % (12/21) пациентов. Полученные данные согласуются с результатами анализа соматических мутаций и указывают на активирующую мутацию и гиперэкспрессию *FGFR3*, а также на наличие мутации *TERT* при отсутствии мутации *TP53*.

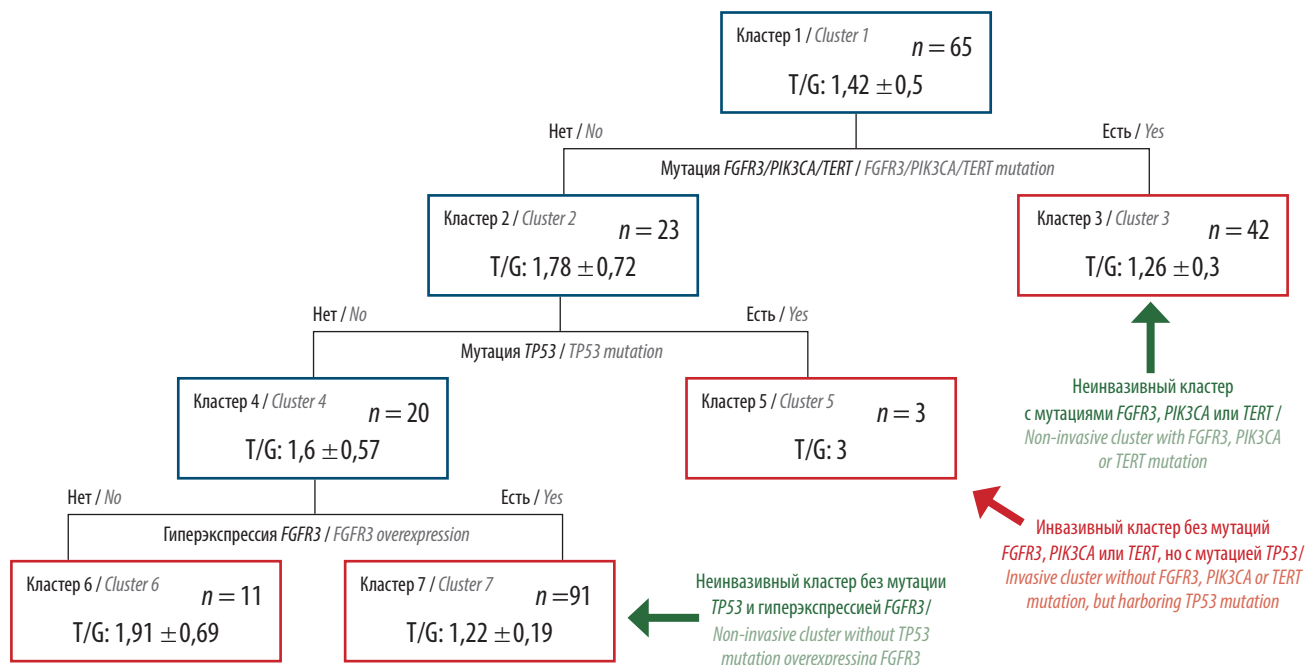


Рис. 1. Кластеры образцов с разной степенью инвазии в зависимости от мутаций и экспрессии исследованных генов. Синим показаны промежуточные группы, красным — конечные кластеры;  $n$  — количество случаев; T/G — инвазия в ряду (Ta—T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/любая G) по шкале от 1 до 3

Fig. 1. Clusters include the samples with different invasion regarding to mutations and gene expression. Intermediate groups are shown in blue, terminal clusters are shown in red;  $n$  — the number of cases; T/G is invasion in order (Ta—T1/low G) > (T1/high G) > (>T2/any G) on a scale from 1 to 3

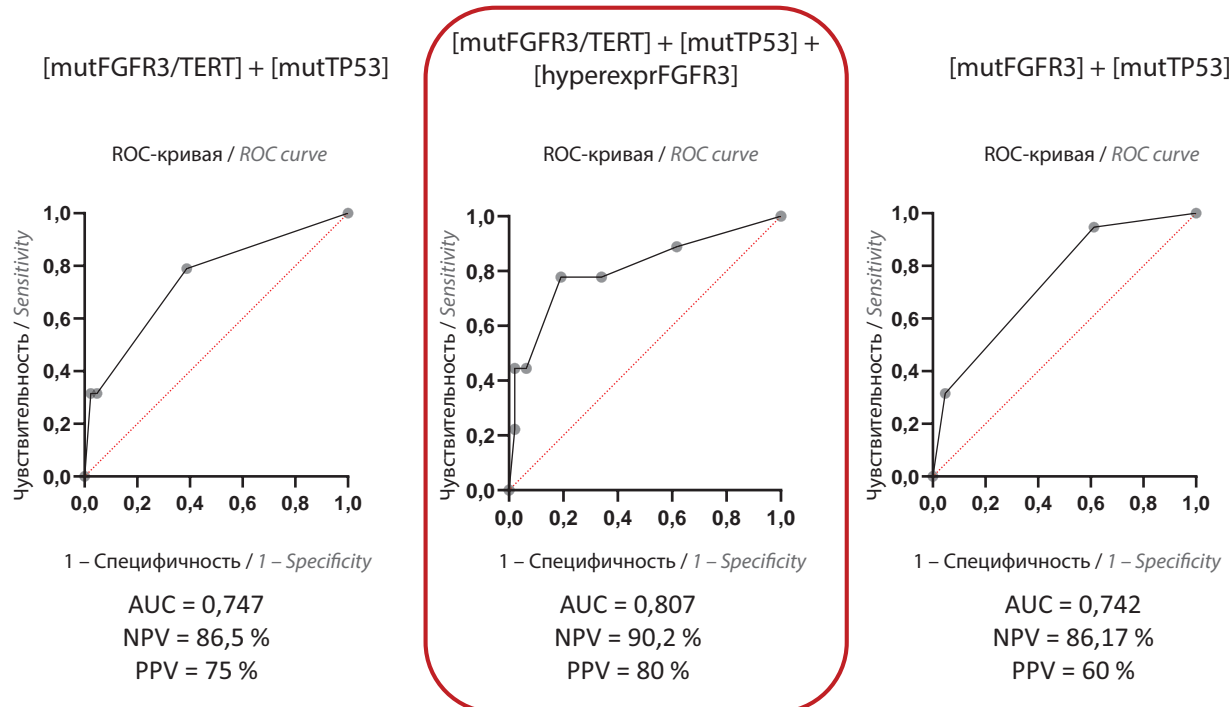


Рис. 2. ROC-кривые при различных сочетаниях классифицирующих признаков, показавших ассоциации со стадиями рака мочевого пузыря. В квадратных скобках указаны независимые переменные; mut — мутация; hyperexpr — гиперэкспрессия; AUC — площадь под ROC-кривой; NPV — предиктивная ценность отрицательного результата; PPV — предиктивная ценность положительного результата

Fig. 2. ROC curves for different combinations of classifiers those were associated with bladder cancer stages. Independent variables are indicated in square brackets; mut — mutation; hyperexpr — overexpression; AUC — area under the curve; NPV — negative predictive value; PPV — positive predictive value



как на наиболее значимые признаки неинвазивных опухолей, тогда как наличие мутации *TP53* увеличивает инвазивность РМП.

### Обсуждение

Определенные нами частоты мутаций в онкогенах *FGFR3*, *PIK3CA* и *TERT*, а также более высокая частота мутаций *TERT* по сравнению с двумя другими генами и преобладание p.S249C среди мажорных мутаций *FGFR3* согласуются с данными других авторов [25]. Вместе с тем в части образцов были выявлены минорные мутации *FGFR3*, также относительно редкими были большинство идентифицированных мутаций *TP53*, 4 из которых описаны нами впервые. Отметим, что мы определяли только точковые мутации в кодирующей части *TP53*, тогда как значительную долю мутаций этого гена составляют протяженные делеции, в связи с чем суммарная частота мутаций *TP53* меньше, чем в цитированном выше источнике. Ассоциация мутаций *FGFR3* с низкой степенью злокачественности, начальными стадиями заболевания и безрецидивной выживаемостью показана ранее и, в целом, не противоречит полученным нами данным [26]. То же касается отрицательной ассоциации мутаций *TP53* с клиническими параметрами, в связи с чем оба гена вошли в предложенную нами прогностическую модель НМИРМП. Сочетанного определения мутаций *FGFR3* и *TP53* в качестве теста с высокой прогностической ценностью при РМП с помощью генетических и ИГХ-методов придерживаются в настоящее время и другие специалисты [27].

По данным ряда авторов, мутации в промоторе *TERT* относятся к частым нарушениям не только в НМИРМП, но и в МИРМП, хотя и в несколько меньшей доле случаев [16]. В связи с этим возникает вопрос об обоснованности включения их в прогностический классификатор при НМИРМП. Однако в нашей работе анализ мутаций этого гена в формате «мутация хотя бы в одном из генов *FGFR3* и/или *TERT*» как одного из исследуемых признаков позволил достичь необходимого количества активирующих мутаций в онкогенах для сравнительного анализа и выявления достоверных ассоциаций (корреляций) между 3 подгруппами в нашей выборке из 125 образцов. Возможно, дальнейшее расширение выборки позволит более точно оценить целесообразность присутствия мутаций промотора *TERT* в прогностической модели. Определение мутаций в рамках предлагаемого алгоритма может иметь прогностическое значение не только с точки зрения отнесения пациента к группе риска прогрессирования НМИРМП, но и для последующей таргетной терапии. Например, наличие активирующей мутации *FGFR3* является показанием для назначения эрдафитиниба — пан-FGFR-ингибитора, который может быть применен у пациентов с местно-распространенным или метастатическим РМП и мутациями в *FGFR2/FGFR3* после прогрессирования на фоне

химиотерапии препаратами платины и неэффективной терапии ингибиторами иммунных контрольных точек [28].

Помимо мутаций в качестве возможных классифицирующих признаков была исследована экспрессия 5 генов. Кластерный анализ показал, что только гиперэкспрессия гена *FGFR3*, но не *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1* или *GATA3* имела прогностическое значение. Отметим, что в некоторых работах с применением метода ПЦР в реальном времени были показаны, например, ассоциация гиперэкспрессии гена *ERBB2* с высоким риском прогрессирования НМИРМП в случае выявления CIS [29] и ассоциация гиперэкспрессии гена *EGFR* с неблагоприятным прогнозом у пациентов с НМИРМП после трансуретральной резекции, получающих адъювантную терапию [30]. Не исключено, что это может быть связано с условным пороговым уровнем гиперэкспрессии, который был установлен нами как трехкратное увеличение экспрессии гена в опухоли относительно нормальной ткани по алгоритму  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  с учетом аналогичных работ [9, 31], чтобы отсеять менее выраженные и низковоспроизводимые результаты по дифференциально экспрессирующимся генам. Мы не обнаружили ассоциации соматических мутаций *FGFR3* с гиперэкспрессией этого гена. В литературе данные о корреляции экспрессии *FGFR3* на уровне матричной РНК и зрелого рецептора неоднозначны [26]. Гиперэкспрессия *FGFR3* может рассматриваться как классифицирующий признак в нашей модели и быть ассоциирована с безрецидивной выживаемостью, по данным различных авторов. В частности, в работе отечественных коллег экспрессию гена *FGFR3* определяли вместе с экспрессией PD-L1 для оценки риска прогрессирования НМИРМП [32]. В работе других авторов с использованием данных TCGA и результатов собственного исследования был составлен прогностический классификатор НМИРМП, в котором экспрессия *FGFR3* и еще группы генов указывает на тот или иной подтип НМИРМП [33].

Отдельного внимания заслуживает вопрос, насколько сложным, многокомпонентным и высокопроизводительным с точки зрения методического подхода должен быть прогностический молекулярно-генетический тест. Первый подход заключается в высокопроизводительном генетическом и ИГХ-профилировании опухолей, затем в отнесении тестируемого образца к 1 из 6 молекулярных подтипов РМП. Вместе с тем метаанализ подобных работ с 2411 образцами РМП показывает, что значительная часть НМИРМП высокого риска демонстрирует на молекулярном уровне основные черты МИРМП [15]. Поэтому в ряде случаев возможно применение второго подхода, заключающегося в тестировании более простыми молекулярно-генетическими методами только наиболее значимых изменений в геноме, которые встречаются при РМП с относительно высокой частотой и могут иметь диагностическое или прогностическое значение. Например, анализ мутаций только в одном гене как диагностических маркеров РМП реализуется

в тест-системе Urodiag® PCR Kit. С ее помощью определяют мутации *FGFR3* методом модифицированной технологии аллель-специфичной ПЦР (MASO-PCR, Mutated Allele Specific Oligonucleotide-PCR) для диагностики рецидива НМИРМП по анализу мочи [34]. Применяют и аналогичные тест-системы с использованием ПЦР для определения в осадке мочи мутаций *TERT* при диагностике РМП и его рецидивов [25]. В связи с этим нам представляется возможным использование анализа мутаций и экспрессии *FGFR3*, *TERT* и *TP53* для оценки инвазивных свойств НМИРМП, который может быть дополнительным инструментом в лабораторной диагностике РМП.

### Заключение

В настоящем исследовании проведен анализ мутаций генов *FGFR3*, *PIK3CA*, *TERT* и *TP53*, а также

экспрессии генов *FGFR3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXA1*, *GATA3* в 125 образцах РМП. Показано, что наличие мутации *FGFR3*, *TERT* и/или гиперэкспрессии *FGFR3* при отсутствии мутации *TP53* указывает на малоинвазивные первичные опухоли. Напротив, присутствие мутации *TP53* свидетельствует о том, что на генетическом уровне опухоль демонстрирует черты МИРМП. Предложенная прогностическая модель может рассматриваться в будущем как дополнительный лабораторный тест при оценке злокачественности НМИРМП, что особенно актуально для оптимизации частоты проведения цистоскопий при мониторинге рецидива и назначения химиотерапии в клинических группах низкого и промежуточного риска рецидивирования соответственно после проведенного хирургического лечения первичного РМП.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2019. 250 p. (In Russ.)].
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
3. Fantini D., Meeks J.J. Genomic classification and risk stratification of bladder cancer. *World J Urol* 2018;37(9):1751–7. DOI: 10.1007/s00345-018-2558-2.
4. Matulay J.T., Kamat A.M. Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. *F1000Res* 2018;7:F1000. DOI: 10.12688/f1000research.14903.1.
5. Audenet F., Attalla K., Sfakianos J.P. The evolution of bladder cancer genomics: What have we learned and how can we use it? *Urol Oncol* 2018;36(7):313–20. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.02.017.
6. Kang H.W., Seo S.P., Byun Y.J. et al. Molecular progression risk score for prediction of muscle invasion in primary T1 high-grade bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2018;16(4):274–80. DOI: 10.1016/j.clgc.2018.02.001.
7. Yousef P.G., Gabril M.Y. An update on the molecular pathology of urinary bladder tumors. *Pathol Res Pract* 2018;214(1):1–6. DOI: 10.1016/j.prp.2017.11.003.
8. Sjodahl G. Molecular subtype profiling of urothelial carcinoma using a subtype-specific immunohistochemistry panel. *Methods Mol Biol* 2018;1655:53–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-7234-0\_5.
9. Tang F., He Z., Lei H. et al. Identification of differentially expressed genes and biological pathways in bladder cancer. *Mol Med Rep* 2018;17(5):6425–34. DOI: 10.3892/mmr.2018.8711.
10. Han Y., Jin X., Zhou H., Liu B. Identification of key genes associated with bladder cancer using gene expression profiles. *Oncol Lett* 2018;15(1):297–303. DOI: 10.3892/ol.2017.7310.
11. Ren R., Tyryshkin K., Graham C.H. et al. Comprehensive immune transcriptomic analysis in bladder cancer reveals subtype specific immune gene expression patterns of prognostic relevance. *Oncotarget* 2017;8(41):70982–1001. DOI: 10.18632/oncotarget.20237.
12. Li S., Liu X., Liu T. et al. Identification of biomarkers correlated with the TNM staging and overall survival of patients with bladder cancer. *Front Physiol* 2017;8:947. DOI: 10.3389/fphys.2017.00947.
13. McConkey D.J., Choi W. Molecular subtypes of bladder cancer. *Curr Oncol Rep* 2018;20(10):77. DOI: 10.1007/s11912-018-0727-5.
14. Chen F., Zhang Y., Bosse D. et al. Pan-urologic cancer genomic subtypes that transcend tissue of origin. *Nat Commun* 2017;8(1):199. DOI: 10.1038/s41467-017-00289-x.
15. Tan T.Z., Rouanne M., Tan K.T. et al. Molecular subtypes of urothelial bladder cancer: results from a meta-cohort analysis of 2411 tumors. *Eur Urol* 2019;75(3):423–32. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.08.027.
16. Creighton C.J. The clinical applications of The Cancer Genome Atlas project for bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018;18(10):973–80. DOI: 10.1080/14737140.2018.1508999.
17. Rosenberg J.E., Hoffman-Censits J., Powles T. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387(10031):19009–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4.
18. Михайленко Д.С., Перепечин Д.В., Ефремов Г.Д. и др. Определение мутаций генов *FGFR3* и *PIK3CA* в ДНК из осадка мочи у больных раком мочевого пузыря. Экспериментальная и клиническая урология 2015;(4):38–41. [Mihaylenko D.S., Perepechin D.V., Efremov G.D., Sivkov A.V., Apolihiin O.I. Detection of *FGFR3* and *PIK3CA* mutations in DNA isolated from urine sediment of bladder cancer patients. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya urologiya* = Experimental and Clinical Urology 2015;(4):38–41. (In Russ.)].

19. Allory Y., Beukers W., Sagrera A. et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol* 2014;65(2):360–6. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.08.052.
20. Defavary R., Lemos J.A., Kashima S. et al. Analysis of the *p53* gene by PCR-SSCP in ten cases of Wilms' tumor. *Sao Paulo Med J* 2000;118(2):49–52. DOI: 10.1590/s1516-31802000000200005.
21. Zvereva M., Pisarev E., Hosen I. et al. Activating telomerase *TERT* promoter mutations and their application for the detection of bladder cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(17):6034. DOI: 10.3390/ijms21176034.
22. Yuan X., Liu T., Xu D. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in thyroid carcinomas: implications in precision oncology—a narrative review. *Ann Transl Med* 2020;8(19):1244. DOI: 10.21037/atm-20-5024.
23. Zehir A., Benayed R., Shah R.H. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23(6):703–13. DOI: 10.1038/nm.4333.
24. Гладков О.А., Матвеев В.Б., Митин Т. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака мочевого пузыря: практические рекомендации RUSSCO. Злокачественные опухоли 2020;10(32)3s2:541–54. [Gladkov O.A., Matveev V.B., Mitin T. et al. Bladder cancer treatment: RUSSCO practical guidelines. *Zlokachestvennye opuholi = Malignant Tumors* 2020;10(32)3s2:541–54. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-32.
25. Necchi A., Madison R., Pal S.K. et al. Comprehensive genomic profiling of upper-tract and bladder urothelial carcinoma. *Eur Urol Focus* 2020:S2405–4569(20)30214–5. DOI: 10.1016/j.euf.2020.08.001.
26. Van Rhijn B.W.G., Mertens L.S., Mayr R. et al. *FGFR3* mutation status and *FGFR3* expression in a large bladder cancer cohort treated by radical cystectomy: implications for anti-FGFR3 treatment? *Eur Urol* 2020;78(5):682–7. DOI: 10.1016/j.eururo.2020.07.002.
27. Hodgson A., van Rhijn B.W.G., Kim S.S. et al. Reassessment of p53 immunohistochemistry thresholds in invasive high grade bladder cancer shows a better correlation with *TP53* and *FGFR3* mutations. *Pathol Res Pract* 2020;216(11):153186. DOI: 10.1016/j.prp.2020.153186.
28. D'Angelo A., Bagby S., Galli I.C. et al. Overview of the clinical use of erdafitinib as a treatment option for the metastatic urothelial carcinoma: where do we stand. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2020;13(10):1139–46. DOI: 10.1080/17512433.2020.1823830.
29. Breyer J., Otto W., Wirtz R.M. et al. *ERBB2* expression as potential risk-stratification for early cystectomy in patients with pT1 bladder cancer and concomitant carcinoma *in situ*. *Urol Int* 2017;98(3):282–9. DOI: 10.1159/000453670.
30. Di Maida F., Mari A., Scalici Gesolfo C. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) cell expression during adjuvant treatment after transurethral resection for non-muscle-invasive bladder cancer: a new potential tool to identify patients at higher risk of disease progression. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(4):e751–8. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.04.008.
31. Yu Y., Liu D., Liu Z. et al. The inhibitory effects of COL1A2 on colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion. *J Cancer* 2018;9(16):2953–62. DOI: 10.7150/jca.25542.
32. Blinova E., Buzdin A., Enikeev D. et al. Prognostic role of *FGFR3* expression status and tumor-related microRNAs level in association with PD-L1 expression in primary luminal non-muscular invasive bladder carcinoma. *Life (Basel)* 2020;10(11):305. DOI: 10.3390/life10110305.
33. Le Goux C., Vacher S., Schnitzler A. et al. Assessment of prognostic implication of a panel of oncogenes in bladder cancer and identification of a 3-gene signature associated with recurrence and progression risk in non-muscle-invasive bladder cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):16641. DOI: 10.1038/s41598-020-73642-8.
34. Roperch J.P., Hennion C. A novel ultra-sensitive method for the detection of *FGFR3* mutations in urine of bladder cancer patients – design of the Urodiag® PCR kit for surveillance of patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). *BMC Med Genet* 2020;21(1):112. DOI: 10.1186/s12881-020-01050-w.

# Вклад авторов

Д.С. Михайленко: проведение большей части экспериментальных исследований, разработка дизайна исследования, написание следующих разделов статьи: «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»;

С.А. Сергиенко: формирование части выборки, написание раздела «Введение», участие в анализе результатов, подбор источников литературы по теме проекта;

Е.Б. Кузнецова: секвенирование мутаций *TERT*;

И.Н. Заборский: работа с базами данных пациентов, формирование части выборки;

М.И. Мартынов: формирование основной части выборки, аннотация образцов клиническими данными;

О.Б. Лоран: участие в составлении дизайна исследования;

Г.Д. Ефремов, С.И. Самойлова: патоморфологическое исследование образцов рака мочевого пузыря;

Б.Я. Алексеев: руководство клинической частью работы;

В.В. Мусатова: статистический анализ результатов исследования;

И.В. Буре: определение мутаций *FGFR3* в части выборки;

М.В. Немцова: участие в анализе результатов работы и написании раздела «Обсуждение».

# Authors' contributions

D.S. Mikhaylenko: performing most of the experimental research, design of the study, writing following sections of the article: Materials and methods, Results, Discussion;

S.A. Sergienko: formation of a sample collection (part), writing the background, participation in the analysis of the results, selection of literature for this project;

E.B. Kuznetsova: sequencing of the *TERT* mutations;

I.N. Zaborsky: working with patient database, forming part of the sample cohort;

M.I. Martynov: formation of the majority of the samples, annotation of cases with clinical data;

O.B. Loran: participation in the design of the study;

G.D. Efremov, S.A. Samoylova: pathomorphological examination of bladder cancer samples;

B.Ya. Alekseev: management of the clinical part of this project;

V.V. Musatova: statistical analysis of the results;

I.V. Bure: determination of the *FGFR3* mutations in part of bladder cancer samples;

M.V. Nemtsova: participation in the analysis of the results and writing the discussion.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Д.С. Михайленко / D.S. Mikhaylenko: <https://orcid.org/0000-0001-9780-8708>

С.А. Сергиенко / S.A. Sergienko: <https://orcid.org/0000-0001-5926-6901>

Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6320>

О.Б. Лоран / O.B. Loran: <https://orcid.org/0000-0002-7531-1511>

Г.Д. Ефремов / G.D. Efremov: <https://orcid.org/0000-0002-8822-8119>

Б.Я. Алексеев / B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

И.В. Буре / I.V. Bure: <https://orcid.org/0000-0003-2043-5848>

М.В. Немцова / M.V.Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке государственного задания на 2020 г. Министерства высшего образования и науки Российской Федерации.

**Financing.** The study was partially supported by the Ministry of Higher Education and Science of Russian Federation for 2020.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России и утвержден Ученым советом 14.01.2019 (протокол № 1); Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (протокол № 9 от 20.12.2018).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia (protocol No. 1 dated 14.01.2019); N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (protocol No. 9 dated 20.12.2018).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.01.2021. Принята к публикации: 28.03.2021.

Article submitted: 05.01.2021. Accepted for publication: 28.03.2021.